

氏 名	RAHMAN, Kazi Anisur
学 位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4744号
学位授与の日付	平成25年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	Investigation of inhibitory effects of semiconductor toothbrush on biofilm formation (半導体内蔵歯ブラシの使用によるバイオフィーム形成抑制効果の検討)
学位論文審査委員	森田 学 教授                      仲野 道代 教授 前田 博史 准教授

### 学位論文内容の要旨

#### Background

*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) plays an important role in the development of dental caries, which is dependent on adherence of the bacteria to tooth surfaces. Semiconductor powders (titanium dioxide,  $\text{TiO}_2$ ) have been shown to have a bactericidal effect for photocatalyzed disinfection of water, while photosensitive  $\text{TiO}_2$  suspended in water was demonstrated to reduce the time of light exposure required to induce disinfection. Furthermore,  $\text{TiO}_2$  has a bactericidal effect on several species of microorganisms, including *Escherichia coli* and *Streptococcus sobrinus* AHT. Previous studies reported that toothbrushes with  $\text{TiO}_2$  embedded in a semiconductor in the body of the brush had better plaque removing potential as compared to conventional toothbrushes, as  $\text{TiO}_2$  was reported to be more sensitive under UV light in water. However, the mechanism related to plaque reduction remains to be elucidated. In this study, we found reduced biofilm formation by *S. mutans* following use of Soladey-3, a newly introduced toothbrush that contains a semiconductor along with a  $\text{TiO}_2$  rod and solar panel. In addition, we visually observed the morphology of the surface of hydroxyapatite pellets after brushing with the Soladey-3 and considered the possible mechanisms related to its effects.

#### Materials and Methods

**1. Hydroxyapatite (HA) pellets and toothbrushes:** HA pellets (10x10x2 mm, APP-100, PENTAX, Tokyo) were employed in this study. For the toothbrushes, we used a Soladey-3 toothbrush (Shiken Ltd. Co., Osaka, Japan) containing a  $\text{TiO}_2$  rod embedded in the neck and a solar panel on the top of the handle of the body, and a regular toothbrush with a stainless steel rod in the neck as a placebo.

**2. Bacterial adherence assay:** HA pellets were divided into 3 groups, then either brushed with the Soladey-3 toothbrush as the experimental (EX group) or the placebo toothbrush (PL group), while the third group was not brushed and used as a control. After brushing, the pellets were placed in 6-well microtiter plates and incubated with *S. mutans* MT8148R cells at 37°C for 6, 12, or 24 hours. Adhered MT8148R organisms were scraped from the HA pellets, placed onto Mitis-Salivarius agar plates, and counted.

**3. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and scanning electron microscope (SEM):** The chemical composition of the HA pellets with and without brushing was analyzed using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and a scanning electron microscope (SEM). Pellets in the EX and PL groups were brushed 10, 20, 30, 40, or 50 times, then exposed to human saliva for 2 hours at 37°C, followed by incubation in distilled water for 24 hours at 37°C. To evaluate the recovery time of the perimeter and area of the HA crystals, pellets brushed 50 times were incubated in distilled water for 12, 24, 48, 72, 96, or 120 hours at 37°C. To evaluate the HA pellet surfaces after brushing and bacterial adherence, they were observed using an SEM.

**4. Statistical analysis:** Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA test, along with Fisher's protected least significant difference (PLSD) post hoc test and Student's *t*-test. A *p*-value <0.05 was considered to be significant.

**Results:** The adherence rate of the EX group was significantly lower than that of the PL group. SEM images revealed that the mean values for the surface area and perimeter length of the HA crystals in the EX group were decreased, while the size decreased with increasing numbers of brushing. Also, some gaps were observed between the crystals along with decreased crystal size. In addition, XPS high-resolution spectra for HA pellets with and without brushing revealed a significant chemical shift of the peak. The high-resolution Ca 2p spectra were shifted into a higher binding energy, while those of P 2p were shifted to a lower binding energy.

**Conclusion:** The Soladey-3 toothbrush has antibacterial effects and can control bacterial adhesion better than common commercially available toothbrushes, according to observed changes of the surface morphology and surface charges caused by brushing. Our findings suggest that this semiconductor toothbrush is useful for control of dental caries.

## 学位論文審査結果の要旨

光触媒活性物質である酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ )は、光触媒作用により酸化還元反応を生じ、電子の移動によりヒドロキシルラジカル ( $\text{OH}\cdot$ ) を産生することが知られている。また、*Escherichia coli* や *Streptococcus mutans* などの細菌に対し、その作用により抗菌作用を示すことが報告されている。このことから、歯ブラシの柄の部分に半導体である  $\text{TiO}_2$  と光触媒効果を持つソーラーパネルを内蔵した歯ブラシ (Soladey-3) が開発された。*S. mutans* は、デンタルプラークと呼ばれる口腔バイオフィルムを形成し、歯面に付着する。付着・堆積した歯は、糖を代謝することにより酸を産生し歯面を脱灰し、齲蝕を発生させる。それゆえに、歯面への *S. mutans* の付着を防ぐことが齲蝕の発生の予防において重要であると考えられている。本研究は、半導体内蔵歯ブラシ (Soladey-3) の使用によって引き起こされる *S. mutans* のアパタイト表面への付着抑制効果とそのメカニズムの検討を行った。研究結果は、以下の通りであった。

1. Soladey-3 を用いてハイドロキシアパタイトペレットをブラッシングし、菌培養液に浸漬した場合、培地にスクロースが存在しない条件下では、6 および 12 時間後の付着した菌数は、コントロール群と比較して有意に減少していた。また、スクロースが存在した場合では、24 時間後において付着した菌数は、コントロール群と比較して有意に減少していた。
2. ハイドロキシアパタイトペレット表層構造を電子顕微鏡で観察したところ、ブラッシング回数が 50 回で、結晶構造の変化が認められ、結晶間にいくつかの空隙が認められた。50 回以下では特に変化はなかった。
3. ブラッシング後のハイドロキシアパタイトペレットの表層を、X 線回折法を用いて、Ca 2P および P 2P スペクトラムのピークを調べることにより、その結合エネルギーの変化を調べた。その結果、実験群とコントロール群では、Ca 2P スペクトルおよび P 2P スペクトルのピークの結合エネルギーにおいて、明らかに電位のピークが変化していた。

Soladey-3 によるブラッシングにより、ハイドロキシアパタイトペレット表層の Ca および P の組成を変化させることがわかった。これらの表面の電位の変化が *S. mutans* との親和性を低下させることにより、*S. mutans* の吸着を阻害したことが示唆された。

これらの結果は、齲蝕の予防において、半導体である酸化チタンと光触媒効果を持つソーラーパネルを内蔵した歯ブラシ (Soladey-3) の使用の有効性を示唆したものである。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文が博士 (歯学) の学位論文として価値があるものと認めた。